

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIULIANNA MACEDO RODRIGUES

**VARIABILIDADE TEMPORAL E INTRAPOPULACIONAL NO ACÚMULO DE
ÁCIDO OCADAICO POR *Chaetodipterus faber* (Broussonet, 1782) NO
COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ**

PONTAL DO PARANÁ

2017

GIULIANNA MACEDO RODRIGUES

**VARIABILIDADE TEMPORAL E INTRAPOPULACIONAL NO ACÚMULO DE
ÁCIDO OCADAICO POR *Chaetodipterus faber* (Broussonet, 1782) NO
COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ**

Monografia apresentada como requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Oceanografia, no Centro de Estudos do Mar,
Setor de Ciências da Terra, Universidade
Federal do Paraná.

Orientadores: Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Jr.
M.Sc. Marcelo Soeth

PONTAL DO PARANÁ

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE:
UFPR / SiBi - Biblioteca do Centro de Estudos do Mar
Caroline Felema dos Santos Rocha – CRB 9/1880

R696v Rodrigues, Giulianna Macedo
Variabilidade temporal e intrapopulacional no acúmulo de ácido ocadaico por *Chaetodipterus faber* (Broussonet, 1782) no complexo estuarino de Paranaguá. / Giulianna Macedo Rodrigues. – Pontal do Paraná, 2017.
44 f.: il.; color.; 29 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Junior.
Orientador: M. Sc. Marcelo Soeth.

Monografia (Graduação) – Curso de Oceanografia, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

1. Alga tóxica - floração. 2. Mariscos - envenenamento diarreico por consumo. 3. Ácido ocadaico. 4. *Chaetodipterus faber* (Peixe). I. Título. II. Mafra Junior, Luiz Laureno. III. Soeth, Marcelo. IV. Universidade Federal do Paraná.

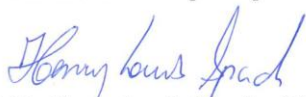
CDD 597

TERMO DE APROVAÇÃO

Giulianna Macedo Rodrigues

“Variabilidade temporal e intrapopulacional no acúmulo de ácido ocadaico por *Chaetodipterus faber* (Broussonet, 1782) no Complexo Estuarino de Paranaguá.”

Monografia aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Henry Louis Spach - CEM/UFPR



Prof. Dr. Maikon Di Domenico - CEM/UFPR



Prof. MSc. Thiago Pereira Alves - IF-SC



Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Júnior
Presidente

Pontal do Paraná, 04 de julho de 2017

À Deise e Edmar, meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Deise e Edmar, não tenho palavras suficientes para agradecer por tudo que vocês me proporcionaram. Obrigada por estarem ao lado durante essa jornada, por todo o apoio e amor, durante os bons e maus momentos. Eu não estaria realizando meu sonho se não fosse por vocês. Ao meu irmão, por todas as aventuras e companheirismo. Às mascotes peludas da família. Amo vocês com todo o meu coração.

Ao Prof. Luiz L. Mafra Jr pela orientação e por me acolher no LAMic nos momentos finais da graduação. Obrigada por todo o aprendizado, ajuda e suporte durante a execução do trabalho.

Ao Marcelo Soeth pela co-orientação, aprendizado sobre peixes e ajuda durante a pesquisa.

Ao Prof. Henry Spach, obrigada por me acolher no Laboratório de Ecologia de Peixes e me mostrar uma luz no fim do túnel.

À Vanessa por todo o apoio, mensagens e longas conversas durante esses anos. As vidas mudaram tanto desde que saímos de casa, mas sei que sempre teremos uma amizade forte, não importando onde a vida nos levar.

À Julia C. pelas aventuras e desabafos ao longo da jornada “monografia”. Sua amizade durante esses anos, principalmente na reta final, ficará para sempre comigo.

Aos moradores – ex-moradores e agregados – da Vila: Ana Emília, Bruna Canal, Caio, Carol Feber, Carol Gusmão, Fabíola, Isabelle, Janayne, Julia Bilibiu e Marina Sutili, Yasmym e às mascotes Kima e Vic, obrigada por todas as jantas, filmes, canastras, churrascos...todos os momentos que passamos juntos.

À equipe Maris – Empresa Júnior de Oceanografia, obrigada por todo o aprendizado, eventos, confraternizações, reuniões, e, principalmente, amizade. Foi pouco tempo, mas vou levar todos e tudo para sempre comigo.

À CAPES pela oportunidade de realizar um intercâmbio que, sem dúvidas, mudou minha vida. E a todas as pessoas que fizeram meu ano na CSUMB ser inesquecível – especialmente Bruno, Ênio e Mari.

Aos amigos do Vale, que mesmo com a distância, a amizade continuou e irá continuar não importando onde estivermos.

À minha família, avós e tios, que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado durante toda a graduação.

Aos funcionários do CEM, em especial D. Ízis, que sempre estiveram à disposição e me ajudaram quando necessário.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia de Peixes e LAMic, pela ajuda sempre que necessário e cafés. À Ana Emília pela amostragem dos parus. À Ligia Luz pela coleta e análise de densidade celular do dinoflagelado.

E à todos, que de alguma forma, fizeram com que meu sonho se realizasse!

“We do not need magic to change the world, we carry all the power we need inside ourselves already: we have the power to imagine better.”

J.K. Rowling

RESUMO

Chaetodipterus faber, pertencente à família *Ephippidae*, é um peixe que possui hábitos alimentares variáveis ao longo de seu ciclo de vida. Entre junho e julho de 2016, no Complexo Estuarino de Paranaguá, houve um evento de floração do dinoflagelado *Dinophysis cf. acuminata*, suspendendo o consumo de moluscos bivalves decorrente da contaminação pela toxina ácido ocadaico. O presente estudo tem como objetivo investigar a concentração da toxina nos fígados da espécie de peixe em questão. Os peixes e dados fitoplactônicos foram coletados, entre dezembro de 2015 e julho de 2016. O ácido ocadaico foi detectado pelo Procedimento Operacional Padrão Harmonizado para a determinação de biotoxinas marinhas lipofílicas em moluscos por LC-MS/MS, da União Europeia. A densidade celular de *D. cf. acuminata* teve um máximo de 9×10^5 células.L⁻¹ e a média de concentração total de ácido ocadaico no fígados dos peixes peixes foi de 7,41 ng/g, durante todo o período amostral, e 15,49, durante o período de floração. A ANOVA mostrou que a concentração total de toxina no peixe não dependeu de seu comprimento total, apenas do período amostral durante a floração (junho e julho/2016). Mesmo o valor máximo encontrado de ácido ocadaico, 61,60 ng/g, esteve abaixo dos limites recomendados para o consumo de moluscos bivalves pelo MPA (160 ng/g). Entretanto, este estudo destaca que os peixes também podem atuar como vetores da toxina durante florações mais intensas de *Dinophysis* spp, não podendo se descartar a possibilidade de eles próprios sofrerem efeitos subletais, em virtude da escassez de estudos sobre contaminação de peixes por ácido ocadaico.

Palavras chave: Alga tóxica - floração, Mariscos - envenenamento diarreico por consumo de mariscos, Ácido ocadaico, *Chaetodipterus faber*.

ABSTRACT

Chaetodipterus faber, member of the family *Ephippidae*, is a fish possessing variables feeding habits throughout its life cycle. Between June and July 2016, in the Paranaguá Estuarine Complex, a major bloom of the dinoflagellate *Dinophysis cf. acuminata* was detected, suspending the consumption of bivalve mollusks due to their contamination by okadaic acid. The present study aims to investigate the concentration of the dinoflagellate toxin in the livers of the abovementioned fish species. Fish and phytoplankton data were collected and measured between December 2015 and July 2016, and the toxin was detected by the European Union Harmonized Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in mollusks by LC-MS/MS. The cell density of *D. cf. acuminata* reached a maximum of $90 \times 10^4 \text{ cells.L}^{-1}$ and the mean total okadaic acid concentration in the fish livers was 7.41 ng/g throughout the entire sampling period and 15.49 during the bloom period. The ANOVA showed that the total concentration of toxin in the fish did not depend on its total length, but only on the sampling period during the bloom (June and July/2016). The maximum okadaic acid found was 61.60 ng/g, which was still below the limits set by MPA for the safe consumption of bivalve mollusks (160 ng/g). However, the study emphasizes that fish can also act as vectors of the toxin during more intense bloom of *Dinophysis* spp. In addition, potential sublethal toxic effects to the fish can not to be discarded due to the lack of studies on the contamination of these organisms by okadaic acid.

Key words: harmful algal boom, diarrhetic shellfish poisoning, okadaic acid, *Chaetodipterus faber*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – EXEMPLAR DE <i>Chaetodipterus faber</i> NO AMBIENTE, COM FAIXAS VERTICAIS EM DESTAQUE.....	16
FIGURA 2 – CÉLULA DE <i>Dinophysis cf. acuminata</i> VISTA EM MICROSCOPIA ÓTICA, COM ESCALA DE 50 μm	18
FIGURA 3 – MAPA DOS PONTOS AMOSTRAIS DO ESTUDO NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ NO PERÍODO DE DEZEMBRO DE 2015 À JULHO DE 2016.....	21
FIGURA 4 – DENSIDADE CELULAR DE <i>Dinophysis cf. acuminata</i> (CÉLULAS.L ⁻¹) NOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM DURANTE PERÍODO DE FLORAÇÃO.....	26
FIGURA 5 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO OCADAICO LIVRE (ng/g) NO FÍGADO DE <i>Chaetodipterus faber</i> EM RELAÇÃO À DENSIDADE DE CÉLULAS (CÉLULAS.L ⁻¹) DE <i>Dinophysis cf. acuminata</i> NOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM DURANTE OS PERÍODOS DE 'FLORAÇÃO' E 'PÓS-FLORAÇÃO'.....	28
FIGURA 6 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ÁCIDO OCADAICO (ng/g) NO FÍGADO DE <i>Chaetodipterus faber</i> EM RELAÇÃO À DENSIDADE DE CÉLULAS (CÉLULAS.L ⁻¹) DE <i>Dinophysis cf. acuminata</i> NOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM DURANTE OS PERÍODOS DE 'FLORAÇÃO' E 'PÓS-FLORAÇÃO'.....	29
FIGURA 7 – VARIAÇÃO DA FORMA CONJUGADA DE ÁCIDO OCADAICO (ng/g) NO FÍGADO DE <i>Chaetodipterus faber</i> EM RELAÇÃO À DENSIDADE CELULAR (CÉLULAS.L ⁻¹) DE <i>Dinophysis cf. acuminata</i> NOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM DURANTE TODO PERÍODO DA FLORAÇÃO.....	30

FIGURA 8 – VARIAÇÃO DO COMPRIMENTO TOTAL (cm) DE <i>Chaetodipterus faber</i> EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ÁCIDO OCADAICO NO FÍGADO (ng/g) DURANTE O PERÍODO DE FLORAÇÃO.....	32
FIGURA 9 – VARIAÇÃO DO PESO (g) DE <i>Chaetodipterus faber</i> EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ÁCIDO OCADAICO NO FÍGADO (ng/g) DURANTE O PERÍODO DE FLORAÇÃO.....	33
FIGURA 10 – VARIAÇÃO DO PESO DO FÍGADO (g) DE <i>Chaetodipterus faber</i> EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ÁCIDO OCADAICO NOS FÍGADOS AMOSTRADOS (ng/g) DURANTE O PERÍODO DE FLORAÇÃO.....	33
FIGURA 11 – CONCENTRAÇÃO TOTAL DE AO NOS FÍGADOS DE <i>Chaetodipterus faber</i> EM RELAÇÃO AO PERÍODO DE FLORAÇÃO. PERÍODOS: 1 (12 DE JUNHO), 2 (15 DE JUNHO), 3 (28 DE JUNHO), 4 (12 DE JULHO), 5 (13 DE JULHO) E 6 (19 DE JULHO). VALORES REPRESENTAM MÉDIA±ERRO PADRÃO. LETRAS DIFERENTES ACIMA DAS BARRAS DE ERRO INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICANTES, ONDE $P<0,05$	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO (DP) DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE <i>Chaetodipterus faber</i> E DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO OCADÁICO, LIVRE, TOTAL E CONJUGADA, DURANTE TODO O PERÍODO AMOSTRAL, ENTRE DEZEMBRO/2015 E JULHO/2016 (n=95) E DURANTE O PERÍODO DE FLORAÇÃO DE <i>Dinophysis cf. acuminata</i> , ENTRE JUNHO E JULHO/2016 (n=45).....	27
TABELA 2 – VALORES MÉDIOS DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO OCADAICO LIVRE NO FÍGADO DE <i>Chaetodipterus faber</i> E DA DENSIDADE CELULAR DE <i>Dinophysis cf. acuminata</i> NOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM, DURANTE OS PERÍODOS DE FLORAÇÃO E PÓS-FLORAÇÃO.....	29
TABELA 3 – VALORES MÉDIOS DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ÁCIDO OCADAICO NO FÍGADO DE <i>Chaetodipterus faber</i> E DA DENSIDADE CELULAR DE <i>Dinophysis cf. acuminata</i> NOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM, DURANTE OS PERÍODOS DE FLORAÇÃO E PÓS-FLORAÇÃO.....	29
TABELA 4 – FREQUÊNCIA RELATIVA DAS CLASSES DE COMPRIMENTO TOTAL (cm), DE ACORDO COM O MÉTODO DE STURGES (1926) COM INTERVALOS DE 5 CM ENTRE AS CLASSES, DURANTE O PERÍODO TOTAL DE AMOSTRAGEM, ENTRE DEZEMBRO/2015 E JULHO/2016, E O PERÍODO DE FLORAÇÃO, JUNHO E JULHO/2016.....	31
TABELA 5 – RESULTADOS OBTIDOS COM A ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) RELACIONANDO A CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ÁCIDO OCADAICO COM OS DIAS AMOSTRADOS E COMPRIMENTO TOTAL DE <i>Chaetodipterus faber</i>	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 Objetivo Geral	19
1.1.2 Objetivos Específicos	19
2 MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1 ÁREA DE ESTUDO	20
2.2 AMOSTRAGEM	22
2.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	22
2.3.1 Extração e Análise do Ácido Ocadaico	22
2.3.2 Hidrólise das Amostras	24
2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	25
3 RESULTADOS	26
4 DISCUSSÃO	35
5 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A família *Ephippidae* é composta por 8 gêneros e 16 espécies de peixes que possuem hábitos alimentares diversificados, incluindo a ingestão de micro e macroalgas e uma ampla diversidade de invertebrados bentônicos e planctônicos (KUITER & DEBELIUS, 2001; NELSON, 2006). Dentre as espécies deste gênero, *Chaetodipterus faber* é o único membro da família presente na margem oeste do oceano Atlântico, sendo bem distribuído na costa leste Norte Americana, desde a Carolina do Sul, nos EUA, até a costa Sul Americana, no litoral de Santa Catarina, Brasil (JOHNSON, 1978; BARROS et al., 2013). Pode ser conhecido como paru, parum ou peixe enxada, dependendo da região do Brasil (FROESE & PAULY, 2017).

O paru possui um corpo comprimido lateralmente, alto e arredondado, com faixas verticais irregulares e escuras, que desaparecem com a idade (FIGURA 1). A boca é pequena, sendo que a maxila de adultos termina por baixo das narinas, possui a cabeça e nadadeiras escaladas, e o opérculo termina em um ponto obtuso (SMITH, 1997; FROESE & PAULY, 2017).

Quando juvenil, o *C. faber*, apresenta um comportamento de mimetismo, imitando folhas e plantas na superfície da água ou em ambientes mais rasos, como praias, recifes ou mangues (KUITER & DEBELIUS, 2001; BARROS et al., 2013). A espécie pode estar associada a recifes de corais, sobretudo os indivíduos adultos, com juvenis geralmente habitando em variados habitats costeiros e estuários (BURGESS, 1978; BARROS et al., 2012). Na costa do Brasil, é encontrado principalmente habitando sistemas estuarinos que estão associados com mangues (DITTY et al., 1994; HEEMSTRA, 2001; BARROS et al., 2015).

A pesca excessiva sobre inúmeras espécies de peixes nas últimas décadas levaram a um decréscimo de muitas populações, fazendo com que espécies que não eram tão consumidas, como *C. faber*, fossem mais valorizadas comercialmente e, conseqüentemente, sofram um maior esforço de captura (IBAMA, 2007; UNIVALI/CTTMar, 2013). A espécie é capturada por pescadores artesanais ao longo da costa brasileira, com uma média anual desembarcada de 250 toneladas nos últimos anos (IBAMA, 2007; MPA, 2012).

FIGURA 1 – EXEMPLAR DE *Chaetodipterus faber* NO AMBIENTE, COM FAIXAS VERTICAIS EM DESTAQUE.



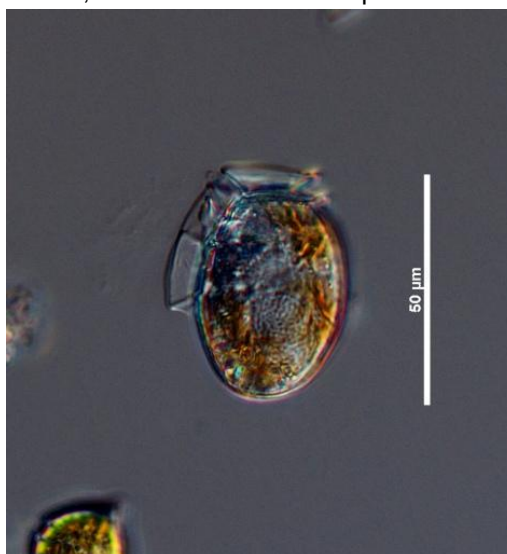
Fonte: Oceanário de Lisboa (2015).

Esses peixes são considerados onívoros, apresentando hábitos alimentares variáveis ao longo do seu ciclo de vida, podendo alimentar-se de micro e macroalgas, da epifauna bentônica de substrato consolidado, de ovos de peixes no ambiente pelágico, além de invertebrados como hidróides, antozoários e poliquetas (HAYSE, 1990; BARROS et al., 2013). Um estudo conduzido por Hayse (1990), na Carolina do Sul, registrou os itens alimentares utilizados nas diferentes fases de vida da espécie, chegando à conclusão de que os peixes juvenis se alimentam principalmente de hidróides e antozoários e os adultos de anfípodes. Em um estudo mais recente realizado por Barros et al. (2013), no rio Caravelas, no nordeste no Brasil, os juvenis de *C. faber* apresentaram grandes quantidades de macroalgas no conteúdo estomacal, seguido de invertebrados, em particular poliquetas. Por possuir esse hábito alimentar diverso, a espécie está sujeita a ingerir, acidentalmente, microalgas bênticas produtoras de toxinas diversas, sobretudo dinoflagelados epífitos, ou ainda, indiretamente, ser contaminada por compostos tóxicos, produzidos por microalgas planctônicas e acumulados em organismos que lhes servem de alimento.

O dinoflagelado *Dinophysis cf. acuminata* (FIGURA 2) é uma espécie de fitoplâncton comumente presentes em baixa abundância no Complexo Estuarino de Paranaguá e se constitui na principal produtora da toxina lipofílica

ácido ocadaico (AO) neste ambiente (MAFRA et al., 2013). O AO é um dos compostos pertencentes ao grupo de toxinas DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning* – Intoxicação diarreica por mariscos). As toxinas diarreicas podem ser acumuladas em concentrações elevadas por diversas espécies de moluscos bivalves e, em menores quantidades, em organismos que se alimentam diretamente do fitoplâncton, e consequentemente, intoxicar humanos consumidores destes pescados contaminados, devido ao seu hábito alimentar de filtração de água, que acumula toxinas em seus tecidos (VALDIGLESIAS et al., 2013). Os derivados acilados análogos do AO mostram uma maior lipossolubilidade comparada com compostos não-estereificados, possuindo atividade tóxica depois de sofrerem hidrólise no trato gastrointestinal humano, levando à manifestação de sintomas gastrointestinais típicos, como diarreia, náusea, vômito e dores abdominais (REGUERA et al., 2014). Microalgas do gênero *Dinophysis* podem provocar surtos de intoxicação diarreica mesmo quando presentes em baixas densidades, i.e. poucas centenas de células por litro de água do mar (REGUERA, 2002). Entretanto, quando espécies produtoras da toxina atingem densidades celulares excessivas, durante eventos conhecidos como florações, os efeitos prejudiciais vão além dos danos à saúde pública relacionados à ingestão de pescados contaminados, mas também impactam o próprio ecossistema causando alterações fisiológicas e ecológicas nos componentes da biota como mortalidade de peixes, moluscos e outros organismos marinhos, devido à forma de assimilação da toxina e tempo de exposição e tempo de retenção da substância (SHUMWAY, 1990; LANDSBERG, 2002; VALDIGLESIAS et al., 2013).

FIGURA 2 – CÉLULA DE *Dinophysis cf. acuminata* VISTA EM MICROSCOPIA ÓTICA, COM ESCALA DE 50 μm .



Fonte: The Phytoplankton Encyclopaedia (2012).

A ocorrência de florações de *D. cf. acuminata* depende de um conjunto de condições oceanográficas e/ou meteorológicas favoráveis que resultam em elevadas densidades celulares da espécie na coluna d'água, e no bioacúmulo de suas toxinas ao longo da teia trófica marinha (CASTRO & MOSER, 2012). Em algumas situações, florações mais intensas podem causar prejuízos econômicos severos às atividades de aquicultura, pesca e turismo na região afetada, além dos impactos ao meio ambiente e saúde pública (HALLEGRAEFF, 1993; SVENSSON, 2003; DYSON & HUPPERT, 2010). E eventos assim vêm aumentando em frequência, intensidade e distribuição geográfica ao longo das últimas décadas (HALLEGRAEFF et al., 2003). Parte do aumento observado é função tanto da dispersão natural de espécies por correntes ou tempestades (ANDERSON et al., 2008), quanto – e principalmente – devido à influência das atividades humanas, como o aumento da eutrofização nas regiões costeiras (ANDERSON et al., 2002), a contaminação marinha por água de lastro (BOLCH & DE SALAS, 2007; BUTRON et al., 2011) e as atuais alterações climáticas (HALLEGRAEFF, 2010; PAERL et al., 2011). Em especial, a disponibilidade de nutrientes é essencial para o crescimento da biomassa do fitoplâncton marinho e situações de alteração das condições meteo-oceanográficas dominantes podem estar relacionadas a um aumento no desenvolvimento, persistência e expansão de florações de muitas espécies tóxicas de microalgas (GRANÉLI &

JOHANSSON, 2003; DYHRMAN, 2008; GRANÉLI et al., 2008; HEISLER et al., 2008; CASTRO & MOSER, 2012).

Durante os meses de junho e julho de 2016, uma extraordinária floração de *D. cf. acuminata* foi registrada ao longo da costa paranaense, incluindo a porção mais externa da Baía de Guaratuba e do Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP). Tal evento fez com que o comércio de moluscos bivalves fosse proibido em todo o estado em decorrência das altas concentrações de ácido ocadaico presente nos organismos (ADAPAR, 2016). Entretanto, durante o mesmo período, o consumo de peixes e de outros organismos ocorreu normalmente na região. Desta forma, informações sobre a biomagnificação desta toxina na cadeia trófica, bem como sobre os níveis em que elas podem atingir em diferentes recursos pesqueiros, são essenciais para a inclusão de medidas de segurança pública em futuras florações de microalgas tóxicas ao longo da costa brasileira. Ademais, tal informação é relevante para outras regiões tropicais e temperadas, em que esta espécie cosmopolita forma florações recorrentes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi investigar o acúmulo de ácido ocadaico no fígado de exemplares de *Chaetodipterus faber* amostrados no CEP e adjacências.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a variabilidade temporal na concentração de ácido ocadaico em *C. faber* antes e durante um evento de floração intensa do dinoflagelado tóxico *D. cf. acuminata* na costa paranaense;
- Avaliar a variabilidade da concentração de ácido ocadaico entre indivíduos de *C. faber* representantes de diferentes classes de tamanho;

- Investigar a metabolização do ácido ocadaico por *C. faber*, por meio da proporção entre as formas livre e conjugada da toxina presentes em seu fígado, fornecendo indícios para se avaliar o quanto recente foi a exposição à toxina.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ÁREA DE ESTUDO

A zona costeira paranaense, localizada no Litoral Sul do Brasil, região oriental do território paranaense, possui 98 km de extensão, com uma ampla planície costeira caracterizada por longas praias arenosas expostas, separadas pelas Baías de Guaratuba, na porção sul, e de Paranaguá, na porção norte (BIGARELLA et al. 1978). O Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP) (25°16'34" S; 48°17'42" W) possui 551.8 km² de corpo d'água e é o maior estuário do estado do Paraná (KOLM et al., 2002; NOERNBERG et al., 2004).

O CEP compreende as baías de Paranaguá, Antonina, das Laranjeiras, Guaraqueçaba e Pinheiros, com seu eixo leste-oeste de extensão aproximada de 56 km e largura máxima de 7 km, e o eixo norte-sul com cerca de 40 km de extensão e 13 km de largura máxima (BIGARELLA et al., 1978).

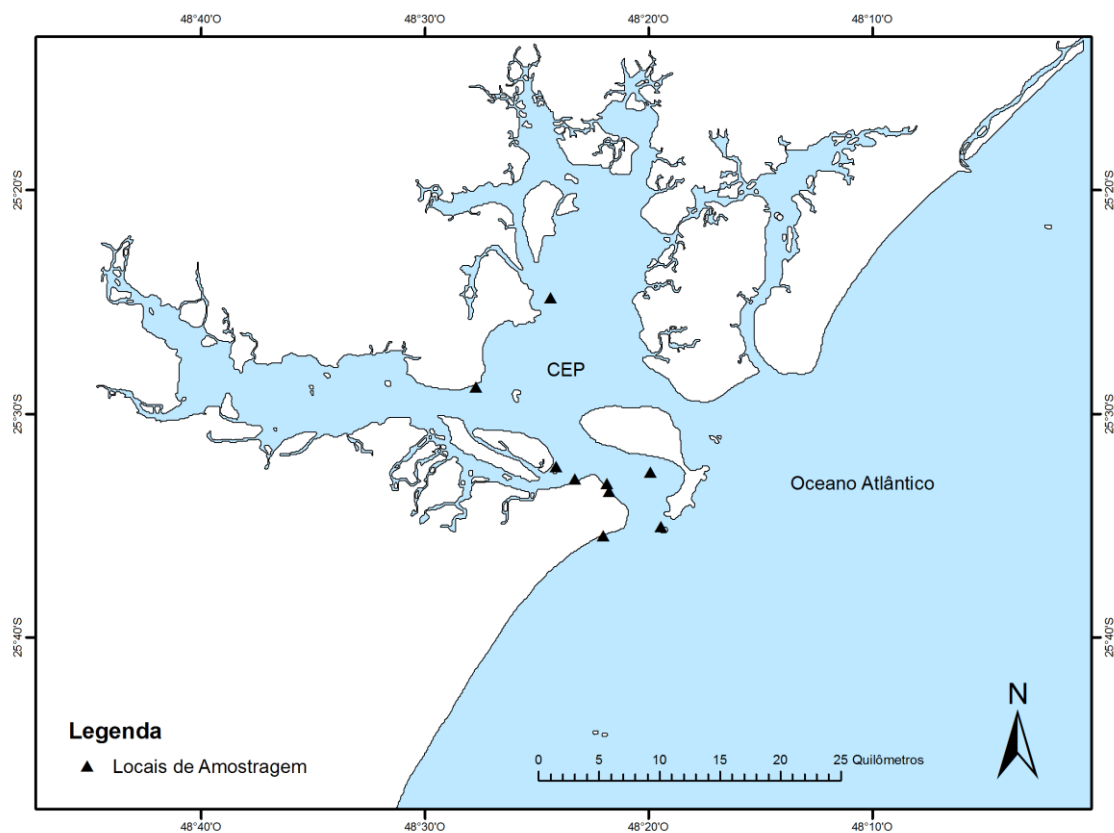
A baía de Paranaguá pode ser dividida em dois setores: oriental e ocidental (BIGARELLA et al., 1978; BRANDINI et al., 1988). O setor oriental consiste de uma extensão do ambiente nerítico e compreende toda entrada do complexo até a parte estuarina. E o setor ocidental consiste na parte mais interna da baía, onde a maior influência é do aporte de água doce (FÁVARO, 2004). De acordo com Lana et al. (2001), o canal principal da baía tem uma profundidade com mais de 10 metros, chegando até 15 metros na área próxima à Paranaguá. Em um estudo Lamour et al. (2004), concluíram que os sedimentos na baía, de forma geral, têm diâmetro médio entre silte fino e areia fina, e são pobremente selecionados.

O clima da região, segundo a classificação de Köppen é Cfa, com pluviosidade média anual de 2500 mm (com picos de 5300 mm) (LANA et al., 2001). A estação chuvosa clássica inicia-se no final da primavera e dura a maior parte do verão, enquanto a estação mais seca dura do final do outono ao

final do inverno, mas é geralmente interrompida por um período chuvoso curto e de baixa intensidade que acontece no início do inverno (LANA *et al.*, 2001; PICHLER, 2005). A salinidade varia de 12 a 29 no verão, e de 20 a 34 no inverno e a temperatura da água entre 23 e 30° C no verão e 18 e 25° C no inverno (LANA *et al.*, 2001).

A baía abriga diversas vilas de pescadores e alguns municípios, como Paranaguá, com uma população aproximada de 140.000 habitantes (IBGE, 2010). Segundo Andriguetto-Filho *et al.* (2006), são 4.277 os pescadores profissionais registrados na Secretaria Especial de Pesca (Seap), e eles dispõem de uma frota de 930 embarcações registradas no Ibama. Considerando o grupo familiar dos pescadores, pode-se estimar que 12 a 15 mil pessoas no litoral estejam dependendo ou sendo beneficiadas por esta atividade (PIERRI *et al.*, 2006).

FIGURA 3 – MAPA DOS PONTOS AMOSTRAIS DO ESTUDO NO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ NO PERÍODO DE DEZEMBRO DE 2015 À JULHO DE 2016.



Fonte: A autora (2017).

2.2 AMOSTRAGEM

As amostragens de *Chaetodipterus faber* foram realizadas no setor mais externo da baía de Paranaguá, entre agosto de 2015 e julho de 2016, nas regiões de Pontal do Sul, Ilha da Galheta e Ilha da Cotinga, com a captura de 311 exemplares da espécie (FIGURA 3). Foram utilizadas diversas artes de pesca, tais como arpão (pesca submarina), rede de caceio (malha de 20-25 cm entre nós opostos), arrasto de porta e rede feiticeira (malha 12 cm + 40 cm nós opostos), cerco de praia (malha 9 cm nós opostos), e picaré (malha 2 mm nós opostos).

Os indivíduos capturados foram levados para o Laboratório de Ecologia de Peixes no Centro de Estudos do Mar (UFPR), acondicionados em sacos plásticos e caixas térmicas. No laboratório, os peixes foram pesados e medidos para obtenção dos comprimentos total e padrão. Os fígados foram dissecados e congelados para a posterior análise.

Durante a floração, foram realizadas coletas de amostras subsuperficiais de água do mar, a fim de se obter a densidade celular de *Dinophysis cf. acuminata*. A coleta foi realizada com garrafa Van Dorn ou diretamente no frasco. As amostras foram divididas em alíquotas de 250 mL e preservadas em solução de lugol 1%. A partir da sedimentação da amostra, foi retirado um volume de 3 a 5 mL e realizada a contagem das células de *D. cf. acuminata* em um microscópio invertido, pelo método de Utermöhl.

2.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

2.3.1. Extração e Análise de Ácido Ocadaico

Para se detectar a concentração do Ácido Ocadaico (AO) nos fígados dos indivíduos capturados, foi utilizada a metodologia de extração de toxinas lipofílicas com metanol (EURLMB, 2015). Para isso, tubos de centrifuga tipo *Falcon* com capacidade para 50 mL foram previamente pesados. Foi coletado, aproximadamente, 1 g das amostras de fígado, previamente congeladas, e transferidas para os tubos, que foram pesados novamente a fim de se obter o peso exato da amostra.

A adição de metanol à amostra foi feita a partir de uma proporção de 9:1, ou seja, o volume de metanol (em mL) corresponde nove vezes o peso da amostra de fígado (em g). Após a adição, os tubos foram levados à sonda de ultrassom (Cole Parmer CPX130; USA), para o rompimento dos tecidos na amostra, durante 2 minutos, a uma potência de 80% em pulsos de 3 segundos com intervalos de 1 segundo. O tubo foi imerso em banho-maria de água gelada durante o processo, para não haver aquecimento excessivo e alteração da amostra. Entre os intervalos de sonicação das amostras, a sonda foi lavada com metanol e secada com papel toalha, para evitar contaminação cruzada.

Após a sonicação, a pasta homogênea obtida foi transferida para tubos *Falcon* de 15 mL e levadas à centrifuga (Fanem Baby I modelo 206), onde foram centrifugadas a 2.000 rpm durante 5 minutos. Foi retirado 1 mL do sobrenadante obtido com uma seringa descartável, e eventuais partículas remanescentes foram removidas por meio da passagem do extrato por um filtro de seringa (PDVF, 13 mm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade), recolhendo o líquido filtrado em um frasco de vidro tipo *vial* com capacidade para 2 mL. O *vial* foi mantido congelado até o momento da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A análise ocorreu num sistema *Agilent* 1260 acoplado a um detector de espectrometria de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS) AbSciex QTRAP3200.

O procedimento utilizado para a separação dos compostos, bem como a detecção e quantificação das toxinas diarreicas, seguiu as recomendações do Procedimento Operacional Padrão Harmonizado para a determinação de biotoxinas marinhas lipofílicas em moluscos por LC-MS/MS, da União Europeia (EURLMB, 2015).

Para tanto, as amostras foram eluídas em uma fase móvel composta por uma mistura de (A) 100% de água com adição de formiato de amônia (2 mM) e ácido fórmico (50 mM), e (B) 95% de acetonitrila (grau HPLC) e 5% de água ultra pura com adição formiato de amônio (2 mM) e ácido fórmico (50 mM). Foi usado um fluxo de 0,3 mL.min⁻¹, com um gradiente de fracionamento da fase móvel de 80:20% (A:B) por 8 minutos, quando a proporção foi alterada para 100% do solvente B, permanecendo assim por 3,5 minutos, para então voltar à condição inicial até o final da análise, que totalizou 13 minutos por amostra. Os compostos foram separados em coluna C18 (50×2,0 mm,

partículas de 3 μm), mantida sob uma temperatura de 20 °C, e então introduzidos na interface Turbo Ion Spray do detector. Nitrogênio de alta pureza, aquecido a 500 °C, foi usado como gás nebulizante e as transições SEM 803,5 \rightarrow 255,2 e 803,5 \rightarrow 113,2 m/z foram monitoradas para a detecção do AO. As concentrações de AO presente em cada amostra foram calculadas por meio do software Analyst[®], a partir de uma curva de calibração feita pela diluição sucessiva de uma solução preparada com o material de referência certificado (NRC, Canadá) em metanol 100%.

2.3.2 Hidrólise das amostras

Além da extração da forma livre do AO, também foi calculada a concentração total de toxina depois de realizada a hidrólise alcalina a partir do extrato metanólico original, seguida por uma nova análise no HPCL. O objetivo desta análise adicional, aplicada a cada amostra, foi detectar a concentração de AO que se encontrava originalmente sob formas moleculares conjugadas no organismo, ou seja, detectar a concentração da toxina incorporada pelo organismo do *C. faber* durante seu processo de detoxificação.

A hidrólise foi realizada seguindo o método descrito em EU-RL-MB (2015), em que 1 mL do sobrenadante de metanol foi transferido para um microtubo *Eppendorff* de 2 mL, adicionando-se 125 μL de NaOH 2,5 M e agitando o frasco em agitador tipo *vórtex* por 3 segundos. Os tubos foram mantidos em banho maria à uma temperatura variando entre 70-76°C durante 40 minutos. Após o resfriamento das amostras em temperatura ambiente, foi adicionado 125 μL de HCl 2,5 M e novamente agitado no *vórtex*, por 3 segundos. Por fim, os extratos foram passados por um filtro de seringa (PDVF, 13 mm de diâmetro e 0,22 μm de porosidade) e armazenados em *vials* previamente identificados, para uma nova análise no HPCL, conforme descrito anteriormente.

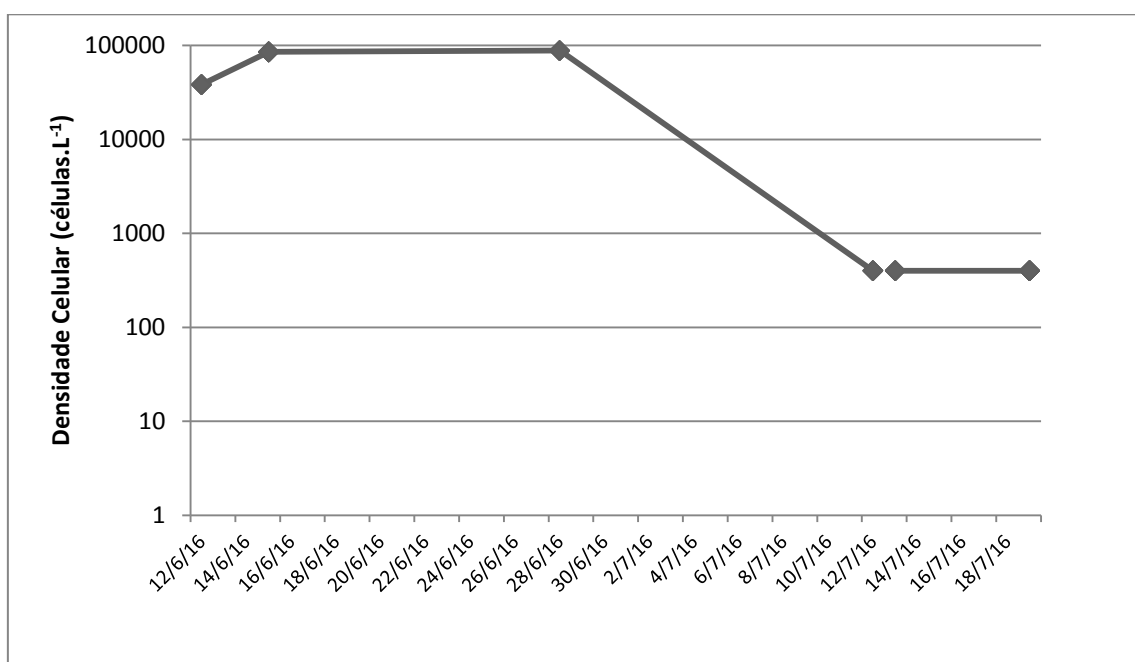
2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliar a significância ($p < 0.05$) dos resultados obtidos, foi realizado um modelo de regressão com logaritmo neperiano (\ln) da concentração total de AO nos fígados dos peixes analisados em relação ao período de floração e comprimento total de *C. faber*, verificando a normalidade dos resíduos, realizando o teste de Shapiro. Também foi realizado uma Análise de Variância (ANOVA), para determinar quais fatores influenciaram na concentração da toxina, e o Teste de Tukey, para comparar as médias encontradas. Para a análise estatística, foi utilizado o software R Studio 3.0.3, com o auxílio das extensões *lsmeans* e *sciplot*.

3 RESULTADOS

Foram analisadas 95 amostras de fígados de *Chaetodipterus faber*, dos quais 45 deles foram coletados durante o período de floração de *Dinophysis cf. acuminata* na região extrema do CEP, entre junho e julho de 2016. A floração de *Dinophysis cf. acuminata* teve seu pico entre os dias 19 e 26 de junho de 2016, com uma densidade celular nos locais de amostragem de aproximadamente 90.000 células.L⁻¹ (FIGURA 4), declinando após esse período. O último registro de densidades celulares moderadas do dinoflagelado na coluna d'água foi no dia 17 de julho de 2016, quando os valores atingiram 500 células.L⁻¹.

FIGURA 4 – DENSIDADE CELULAR DE *Dinophysis cf. acuminata* (CÉLULAS.L⁻¹) NOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM DURANTE PERÍODO DE FLORAÇÃO.



Fonte: A autora (2017).

No período da floração, a média (n=45) do comprimento total dos peixes foi de 15,78 cm, com desvio padrão de 8,73 cm. O peso médio deste grupo de peixes foi de 268,90 g, com desvio de 296,41, e o peso do fígado teve média de 4,52 g e desvio padrão de 5,52 g (TABELA 1).

A concentração média de ácido ocadaico (AO) na forma molecular livre (i.e. antes da hidrólise alcalina) nos fígados analisados, durante a floração, foi

de $13,79 \text{ ng.g}^{-1}$ (com desvio padrão de $13,27 \text{ ng.g}^{-1}$), sem evidências de contaminação nos peixes amostrados antes de junho. Já o valor médio da concentração total de AO (i.e. somando-se as formas livres e conjugadas) nos fígados foi de $15,49 \text{ ng.g}^{-1}$ (desvio padrão de $15,07 \text{ ng.g}^{-1}$), e o valor médio da concentração na forma conjugada de AO (i.e. a quantidade de toxina em processo de metabolização pelo *C. faber*), foi de $1,70 \text{ ng/g}$, durante o período de floração.

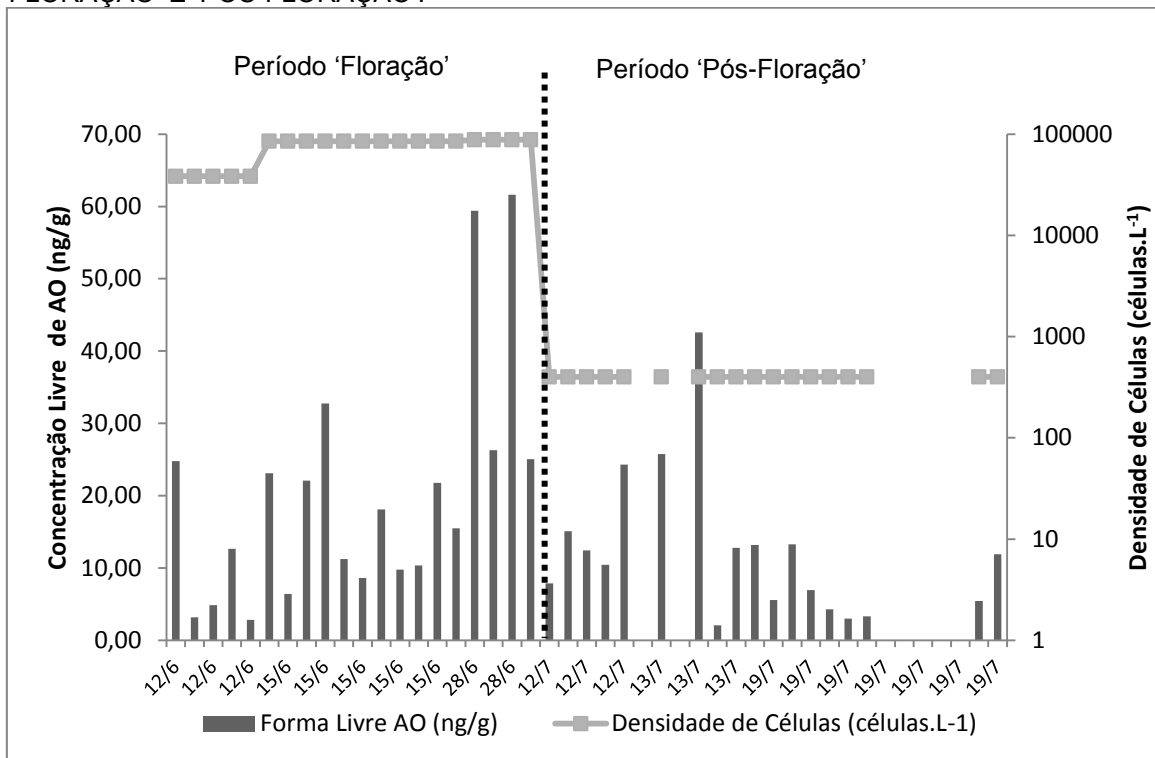
TABELA 1 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO (DP) DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *Chaetodipterus faber* E DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO OCADÁICO, LIVRE, TOTAL E CONJUGADA, DURANTE TODO O PERÍODO AMOSTRAL, ENTRE DEZEMBRO/2015 E JULHO/2016 (n=95) E DURANTE O PERÍODO DE FLORAÇÃO DE *Dinophysis cf. acuminata*, ENTRE JUNHO E JULHO/2016 (n=45).

Parâmetros <i>C. faber</i>	Período Amostral		Período de Floração	
	Média	DP	Média	DP
Comprimento Total (cm)	18,79	9,74	15,78	8,73
Peso (g)	434,72	667,59	268,90	296,41
Peso fígado (g)	6,38	9,75	4,52	5,52
Forma livre de AO (ng/g)	6,58	11,92	13,79	13,27
Concentração Total de AO (ng/g)	7,41	12,89	15,49	15,07
Forma conjugada de AO	0,82	2,50	1,70	3,44

Fonte: A autora (2017).

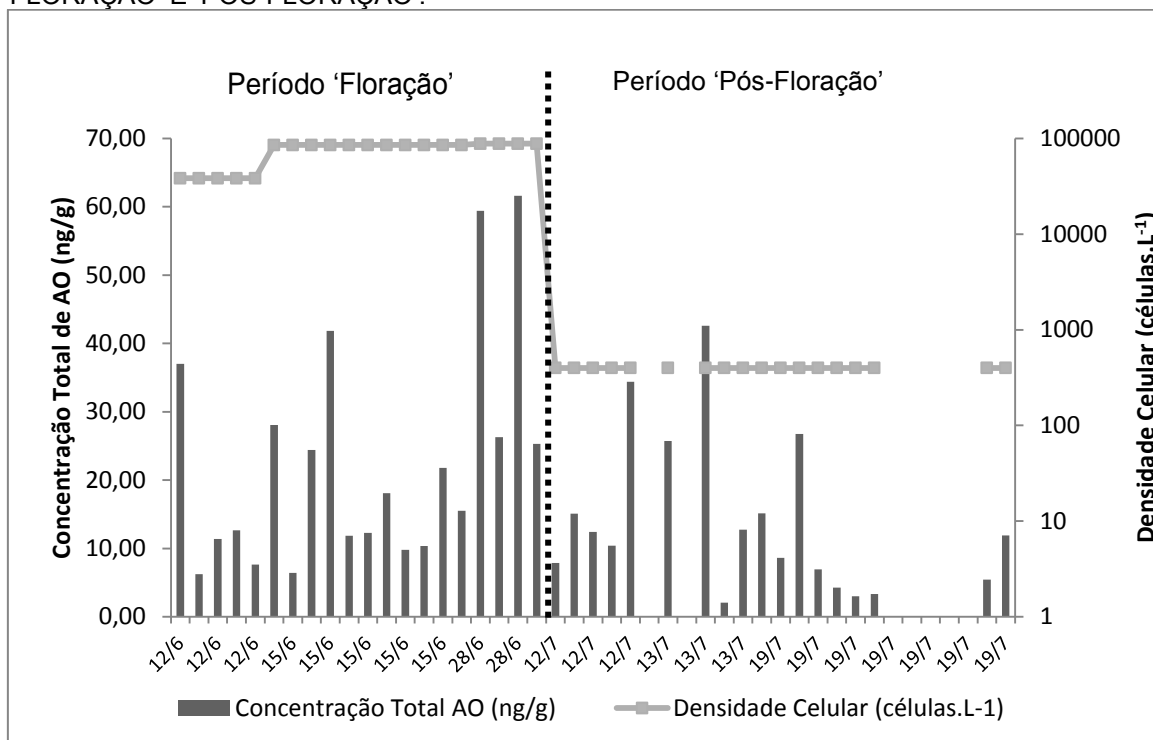
Como indicado nas FIGURAS 5 e 6, o evento de floração de *D. cf. acuminata* foi dividido em dois períodos: ‘Floração’ e ‘Pós- Floração’ a partir do dia 12 de julho, quando se percebe uma queda abrupta na densidade celular do dinoflagelado e gradual na concentração de ácido ocadaico nos fígados dos parus analisados. Os valores médios das concentrações livre e total de ácido ocadaico no período ‘Floração’, respectivamente $20,02 \text{ ng/g}$ e $22,40 \text{ ng/g}$, foram superiores aos valores reportados no período ‘Pós-Floração’ – $8,81 \text{ ng/g}$ e $9,96 \text{ ng/g}$ respectivamente (TABELA 2 e 3).

FIGURA 5 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO OCADAICO LIVRE (ng/g) NO FÍGADO DE *Chaetodipterus faber* EM RELAÇÃO À DENSIDADE DE CÉLULAS (CÉLULAS.L⁻¹) DE *Dinophysis cf. acuminata* NOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM DURANTE OS PERÍODOS DE 'FLORAÇÃO' E 'PÓS-FLORAÇÃO'.



Fonte: A autora (2017).

FIGURA 6 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ÁCIDO OCADAICO (ng/g) NO FÍGADO DE *Chaetodipterus faber* EM RELAÇÃO À DENSIDADE DE CÉLULAS (CÉLULAS.L⁻¹) DE *Dinophysis cf. acuminata* NOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM DURANTE OS PERÍODOS DE 'FLORAÇÃO' E 'PÓS-FLORAÇÃO'.



Fonte: A autora (2017).

TABELA 2 – VALORES MÉDIOS DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO OCADAICO LIVRE NO FÍGADO DE *Chaetodipterus faber* E DA DENSIDADE CELULAR DE *Dinophysis cf. acuminata* NOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM, DURANTE OS PERÍODOS DE FLORAÇÃO E PÓS-FLORAÇÃO.

Período	Média da Concentração Livre de Ácido Ocadaico (ng/g)	Média da Densidade Celular (células.L ⁻¹)
Floração	20,02	74.059
Pós-Floração	8,81	400

Fonte: A autora (2017).

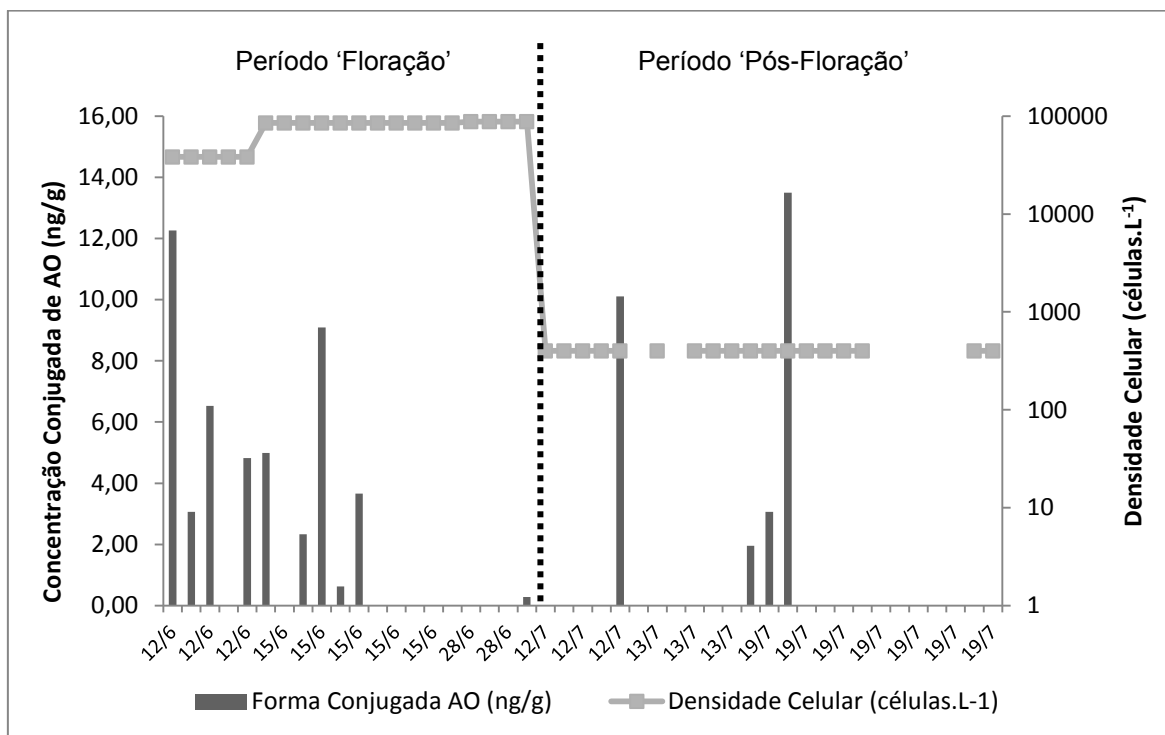
TABELA 3 – VALORES MÉDIOS DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ÁCIDO OCADAICO NO FÍGADO DE *Chaetodipterus faber* E DA DENSIDADE CELULAR DE *Dinophysis cf. acuminata* NOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM, DURANTE OS PERÍODOS DE FLORAÇÃO E PÓS-FLORAÇÃO.

Período	Média da Concentração Total de Ácido Ocadaico (ng/g)	Média da Densidade Celular (células.L ⁻¹)
Floração	22,40	74.059
Pós-Floração	9,96	400

Fonte: A autora (2017).

A concentração de ácido ocadaico sob formas conjugadas, calculada como a diferença entre a concentração total e livre de AO, e que representa a quantidade de toxina em processo de metabolização pelos indivíduos de *C. faber* no momento da coleta ou incorporado pela transferência trófica através se sua dieta, teve seus maiores valores reportados no período após a floração de *D. cf. acuminata*, quando o fígado de alguns indivíduos chegou a conter até 13,49 ng/g da toxina nestas formas moleculares (FIGURA 7).

FIGURA 7 – VARIAÇÃO DA FORMA CONJUGADA DE ÁCIDO OCADAICO (ng/g) NO FÍGADO DE *Chaetodipterus faber* EM RELAÇÃO À DENSIDADE CELULAR (CÉLULAS.L⁻¹) DE *Dinophysis cf. acuminata* NOS LOCAIS DE AMOSTRAGEM DURANTE TODO PERÍODO DA FLORAÇÃO.



Fonte: A autora (2017).

A divisão dos peixes em classes de comprimento total (cm) (TABELA 4), seguindo o Método de Sturges resultou em um total de 10 classes de tamanho, com intervalos de 5 cm. O maior número de exemplares (n=28) foi enquadrado na classe 4, entre 15,1 e 20 cm, com uma frequência relativa de 29,47%, seguido da classe 5 (n=20), entre 20,1 e 25 cm, com uma frequência relativa de 21,05%. No período de floração, entre junho e julho/2016, o maior número de peixes (n=16), assim como no período total de amostragem, era pertencente à classe 4 (TABELA 4), com uma frequência relativa de 35,56%. No período

total de amostragem, de dezembro/2015 à julho/2016, o valor médio para classe de tamanho foi de 4,2, com desvio padrão de 2, e durante o período de floração, entre junho e julho/2016, o valor médio de 3,6, com desvio padrão de 1,8.

TABELA 4 – FREQUÊNCIA RELATIVA DAS CLASSES DE COMPRIMENTO TOTAL (cm), DE ACORDO COM O MÉTODO DE STURGES (1926) COM INTERVALOS DE 5 CM ENTRE AS CLASSES, DURANTE O PERÍODO TOTAL DE AMOSTRAGEM, ENTRE DEZEMBRO/2015 E JULHO/2016, E O PERÍODO DE FLORAÇÃO, JUNHO E JULHO/2016.

Classes de Comprimento Total	Período de Amostragem		Período de Floração	
	n	Frequência Relativa %	n	Frequência Relativa %
Classe 1 (0 – 5)	13	13,68	13	28,89
Classe 2 (5,1 – 10)	4	4,21	0	0
Classe 3 (10,1 – 15)	10	10,53	2	4,44
Classe 4 (15,1 – 20)	28	29,47	16	35,56
Classe 5 (20,1 – 25)	20	21,05	9	20
Classe 6 (25,1 – 30)	10	10,53	3	6,67
Classe 7 (30,1 – 35)	6	6,31	2	4,44
Classe 8 (35,1 – 40)	0	0	0	0
Classe 9 (40,1 – 45)	2	2,11	0	0
Classe 10 (45,1 – 50)	2	2,11	0	0

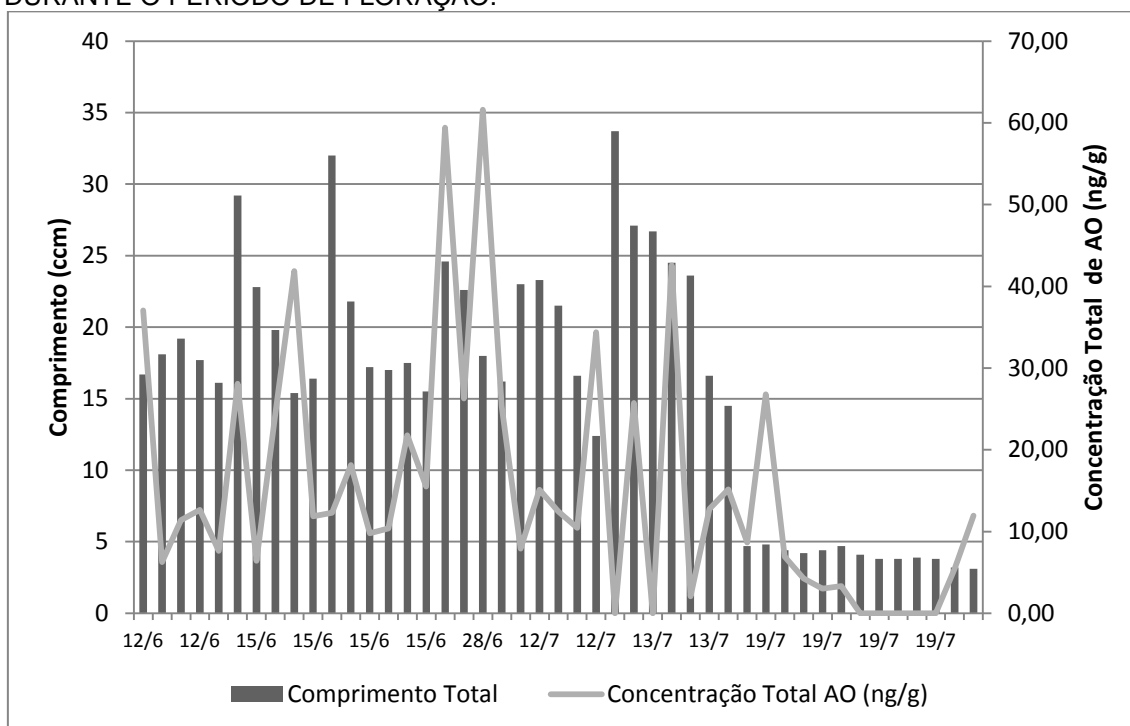
Fonte: A autora (2017).

Não foi encontrada uma relação clara entre o do comprimento total (cm) do *C. faber* e a concentração total de ácido ocadaico (ng/g) nos fígados dos indivíduos amostrados de *C. faber* durante o período de floração (FIGURA 8). O mesmo se observa na comparação entre peso total de *C. faber* e o peso dos fígados em relação à concentração total de toxina (FIGURA 9 e 10). Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas, nota-se que as maiores concentrações, foram encontradas nos peixes com maior comprimento total, e os menores peixes registraram menores concentrações totais de ácido ocadaico (FIGURA 8).

Utilizando o modelo de regressão com logaritmo neperiano (ln) da concentração total de AO nos fígados dos peixes analisados em relação ao período de floração e comprimento total de *C. faber* (Ct), a normalidade dos resíduos foi alcançada, e o modelo foi significativo em relação à toxina e ao período de floração, após teste de Shapiro. A Análise de Variância (ANOVA) mostrou que a concentração total de AO não tem relação com o Ct, apenas

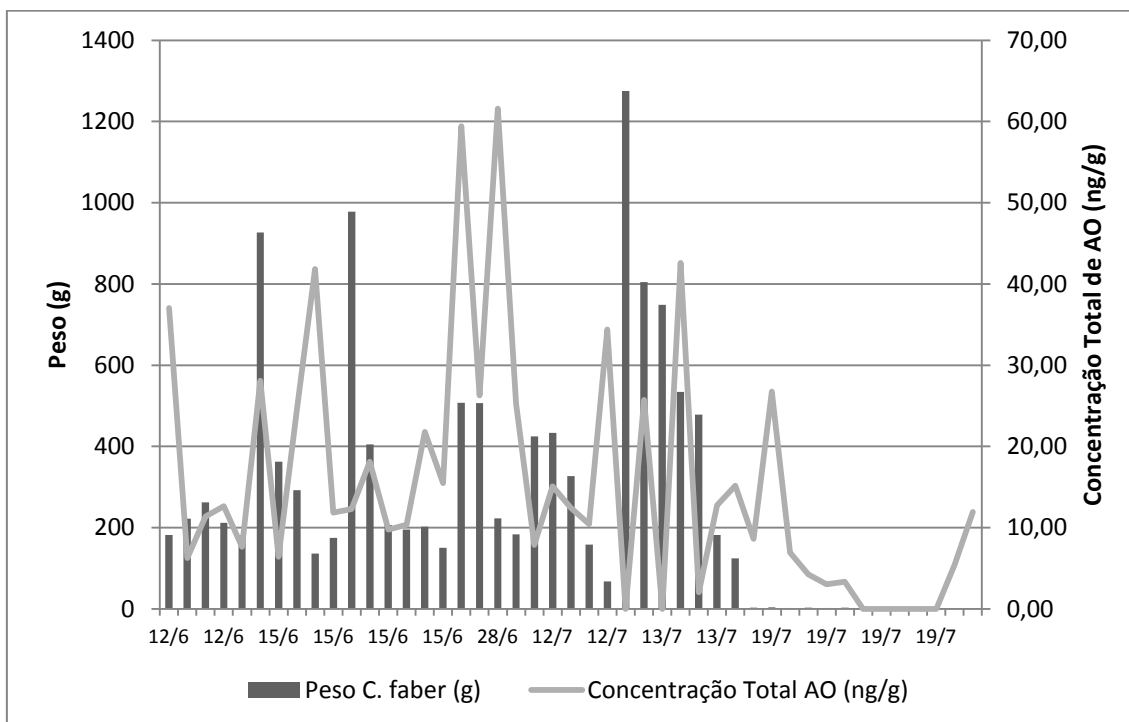
com o período de floração (junho e julho/2016), que explicou 36% ($r^2=0,3661$ e $p<0,05$) da variabilidade nos resultados encontrados da concentração total de AO (TABELA 5).

FIGURA 8 – VARIAÇÃO DO COMPRIMENTO TOTAL (cm) DE *Chaetodipterus faber* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ÁCIDO OCADAICO NO FÍGADO (ng/g) DURANTE O PERÍODO DE FLORAÇÃO.



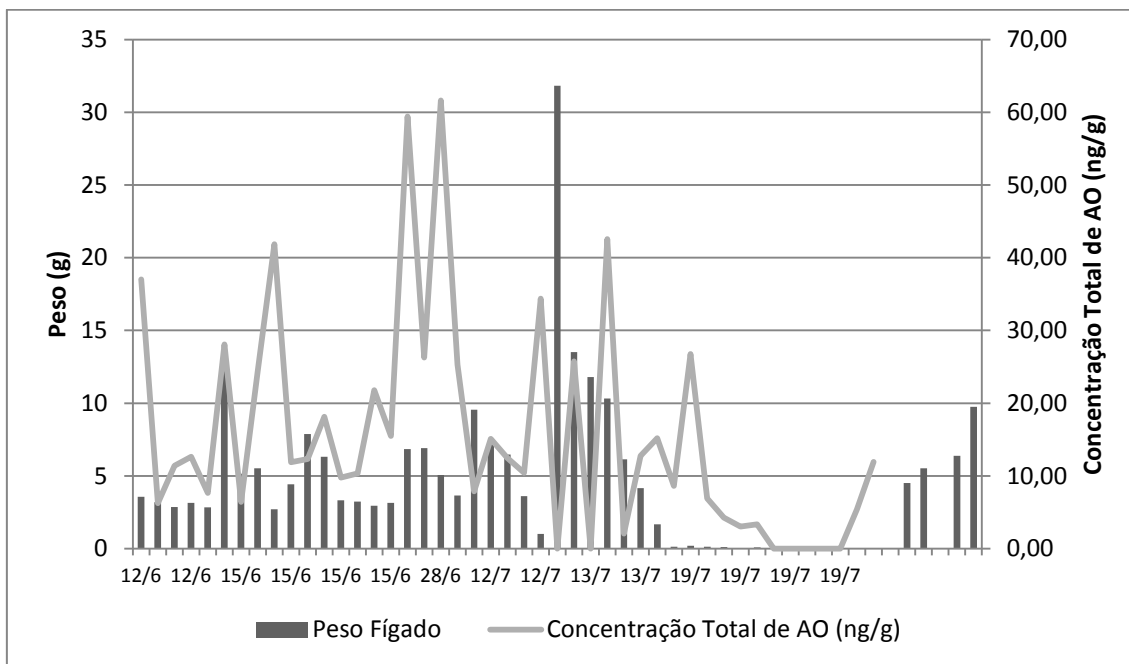
Fonte: A autora (2017).

FIGURA 9 – VARIAÇÃO DO PESO (g) DE *Chaetodipterus faber* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ÁCIDO OCADAICO NO FÍGADO (ng/g) DURANTE O PERÍODO DE FLORAÇÃO.



Fonte: A autora (2017).

FIGURA 10 – VARIAÇÃO DO PESO DO FÍGADO (g) DE *Chaetodipterus faber* EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ÁCIDO OCADAICO NOS FÍGADOS AMOSTRADOS (ng/g) DURANTE O PERÍODO DE FLORAÇÃO.



Fonte: A autora (2017).

TABELA 5 – RESULTADOS OBTIDOS COM A ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) RELACIONANDO A CONCENTRAÇÃO TOTAL DE ÁCIDO OCADAICO COM OS DIAS AMOSTRADOS E COMPRIMENTO TOTAL DE *Chaetodipterus faber*.

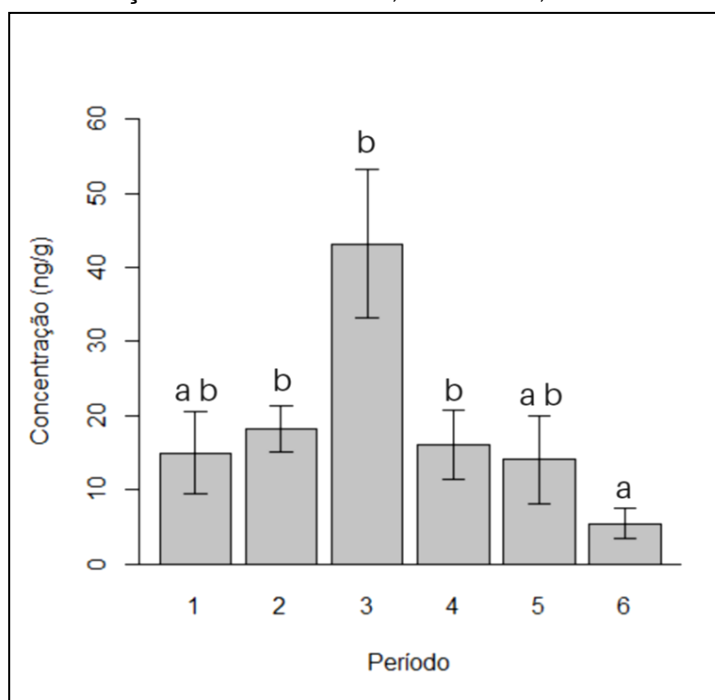
	Df	Mean Sq	F value	p
Dia	5	5,3588	5,8549	0,0004189
Ct	1	1,9577	2,1390	0,1518205

Fonte: A autora (2017).

Legenda: Dia = períodos de floração; Ct = Comprimento total de *Chaetodipterus faber*.

O teste de Tukey aplicado às concentrações totais de AO em relação ao período amostral e ao comprimento total de *C. faber*, mostrou que há diferenças significantes na concentração de toxina acumulada no fígado dos peixes em relação aos dias amostrados durante a floração (p valor ajustado <0,05), com as maiores concentrações detectadas nas coletas realizadas entre 15 de junho e 12 de julho, sendo o pico em 28 de junho (períodos amostrais 2, 3 e 4, representados pela letra 'b' na FIGURA 11).

FIGURA 11 – CONCENTRAÇÃO TOTAL DE AO NOS FÍGADOS DE *Chaetodipterus faber* EM RELAÇÃO AO PERÍODO DE FLORAÇÃO. PERÍODOS: 1 (12 DE JUNHO), 2 (15 DE JUNHO), 3 (28 DE JUNHO), 4 (12 DE JULHO), 5 (13 DE JULHO) E 6 (19 DE JULHO). VALORES REPRESENTAM MÉDIA±ERRO PADRÃO. LETRAS DIFERENTES ACIMA DAS BARRAS DE ERRO INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICANTES, ONDE $P < 0,05$.



Fonte: A autora (2017).

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, o período de floração do dinoflagelado *Dinophysis cf. acuminata* ao longo da costa paranaense ocorreu entre os dias 12 de junho a 17 de julho, com densidade celular atingindo até 9.10^5 células.L⁻¹, nos pontos amostrais incluídos neste estudo. Este valor é superior aos valores de densidade celular máximos registrados em eventos de floração anteriores da mesma espécie no sul do Brasil, como 7.10^5 células.L⁻¹ em janeiro de 2007 e $4,7.10^4$ células.L⁻¹ em março de 2008, ambas no estado de Santa Catarina (PROENÇA et al., 2007; MAFRA et al., 2015).

A concentração de ácido ocadaico, tanto total quanto livre, nos fígados de *Chaetodipterus faber*, teve um valor médio de 15,49 ng/g e 13,79 ng/g, respectivamente, durante a floração. O maior valor de toxina de *Dinophysis cf. acuminata* encontrado em um único indivíduo (com peso de 223,16 g e comprimento total de 18 cm) foi de 61,60 ng/g, no período “de pico da floração”. No Brasil, não há uma legislação específica para o comércio de peixes contaminados por toxinas de microalgas. Por outro lado, o MPA (2012) determina a suspensão do comércio de moluscos bivalves quando uma amostra representativa destes indivíduos apresenta valores acima de 160 ng/g de ácido ocadaico em uma determinada área. Apesar de que os valores encontrados para *C. faber* estão bem abaixo do limite imposto para o comércio de moluscos bivalves, o presente estudo destaca que peixes também podem atuar como vetores da toxina durante florações mais intensas de *Dinophysis* spp.

Apesar de conter concentrações de ácido ocadaico consideradas insuficientes para desencadear o envenenamento diarreico em consumidores humanos, os próprios parus contaminados podem sofrer consequências negativas decorrentes da ingestão da toxina. Sendo assim, as consequências da exposição de *C. faber* a doses moderadas da toxina não estariam necessariamente associadas a efeitos gastrointestinais em seus consumidores, mas sim a danos aos estágios reprodutivos com possíveis implicações em nível populacional, por exemplo, Escoffier et al. (2007) incubaram embriões da espécie de peixe *Oryzias latipes* em um meio contendo ácido ocadaico e

observaram um retardo no desenvolvimento embrionário e a redução dose-dependente na taxa de sobrevivência, atingindo 100% da mortalidade em uma concentração de 0,75-1 µg/mL.

As concentrações totais de ácido ocadaico, bem como da forma livre da toxina, que caracteriza sua ingestão recente, foram superiores durante o pico da floração em relação ao período caracterizado como “Pós-Floração” (de 12 de julho até 19 de julho de 2016), indicando uma contaminação majoritária de *C. faber* ainda durante o evento de floração de *D. cf. acuminata*. Entretanto, a contaminação continuou ocorrendo no período “Pós-Floração” e a concentração da toxina na forma conjugada, que indica a ingestão de organismos contaminados e um processo de detoxificação em curso, atingiu os maiores valores (máximo de 13,49 ng/g) neste mesmo período, compatível com o nível trófico ocupado pela espécie. De acordo com Froese & Pauly (2017), o nível trófico de *C. faber* baseado em sua dieta pode variar entre 3,0 e 4,5, dependendo do ambiente que habita, o que posiciona a espécie entre consumidor secundário e quaternário e justificaria um certo atraso na incorporação de toxinas durante um evento tóxico.

Num estudo realizado na Carolina do Sul, EUA, por Hayse (1990), a dieta de *C. faber* foi investigada em ambientes distintos. Nos peixes capturados em estuários, a maior parte da dieta era composta por hidróides; nos peixes de águas rasas (<20 m), os componentes principais da dieta eram antozoários; e nos peixes de recifes, os anfípodes eram os principais itens da dieta. Já no estudo conduzido por Barros et al. (2013), no estuário do rio Caravelas, na Bahia, os principais itens alimentares de *C. faber* foram macroalgas e poliquetas, comprovando a flexibilidade no comportamento alimentar da espécie. Com isso, a alta concentração de ácido ocadaico na forma conjugada durante o período “Pós-Floração” pode se dar não somente pela metabolização da toxina pelo próprio peixe, mas também pela ingestão destas formas moleculares a partir de organismos contaminados de níveis tróficos inferiores, que ingeriram direta ou indiretamente as toxinas de *D. cf. acuminata*.

Os registros de acúmulo de ácido ocadaico por peixes são escassos. Em um dos raros relatos, Sipia et al. (2000) mediram 222 ± 10 ng/g de ácido ocadaico em fígados de uma espécie de linguado (*Platichthys flesus*), no norte do Mar Báltico. As maiores concentrações de toxina no linguado em relação

àquelas registradas em *C. faber* no presente estudo podem ser explicadas pelas diferenças entre a dieta das espécies, já que *C. faber* tem uma dieta mais variada e o linguado se alimenta preferencialmente de zoobentos e moluscos bivalves, que acumulam grandes quantidades da toxina. Outro estudo, por Mafra et al. (2014), detectou baixas concentrações (até 44 ng/g) de ácido ocadaico no fígados do peixe filtrador *Cetengraulis edentulus*, na Baía de Paranaguá.

A concentração total de ácido ocadaico em *C. faber*, média de 15,49 ng/g, pode ser comparada com as encontradas em vertebrados superiores, como o peixe-boi (*Trichechus manatus latirostris*) e a tartaruga verde (*Chelonia mydas*), conforme registrado na costa da Flórida, EUA, por Capper et al. (2013). As concentrações encontradas no peixe-boi e a tartaruga verde foram de 16,1 ng/g e 8,7 ng/g, respectivamente. O peixe-boi possui uma dieta herbívora, se alimentando de macroalgas, e acidentalmente, de organismos menores como plânctons e cnidários. Já a tartaruga verde tem dieta considerada onívora, alimentando-se tanto de macroalgas como de pequenos invertebrados, crustáceos e águas vivas. A maior concentração da toxina no peixe-boi, valor próximo da média encontrada em *C. faber*, seria explicado pela sua dieta, já que seu nível trófico é mais baixo do que a tartaruga verde. Em conjunto com os resultados do presente estudo, isso indica a baixa persistência do ácido ocadaico em organismos consumidores e seu baixo potencial de biomagnificação nas cadeias tróficas marinhas.

Não foi observado, no presente estudo, relação entre o tamanho de *C. faber* e as concentrações totais de ácido ocadaico acumuladas nos fígados durante o período de floração de *D. cf. acuminata*, nem em relação ao peso de *C. faber*. Isso pode ser explicado em virtude das diferentes técnicas de captura de indivíduos utilizadas em datas amostrais distintas, já que as diferentes classes de tamanho dos peixes não foram amostradas durante todo o período de floração.

5 CONCLUSÃO

A partir do desenvolvimento do presente estudo, pode-se concluir que peixes de níveis tróficos superiores podem ser contaminados por toxinas diarreicas durante florações intensas das microalgas produtoras. A população de *Chaetodipterus faber* residente no Complexo Estuarino de Paranaguá acumulou quantidades baixas a moderadas de ácido ocadaico durante uma floração de *Dinophysis cf. acuminata* registrada na costa paranaense entre junho e julho de 2016.

A densidade celular do dinoflagelado tóxico determinou a variação da concentração da toxina nos peixes durante o evento, independentemente de variáveis individuais dos peixes contaminados, como peso ou comprimento total.

Os valores encontrados estão abaixo dos níveis regulatórios estabelecidos no Brasil para o consumo humano de moluscos bivalves contaminados (<160 ng/g), mas sua relevância toxicológica não deve ser descartada em virtude da escassez de estudos sobre contaminação de peixes, sobretudo carnívoros, por ácido ocadaico. Com isso, estudos futuros devem ser realizados a fim de avaliar as consequências da exposição tanto da espécie em questão quanto de outras espécies consumidas por humanos a toxinas durante florações de algas nocivas. Além do acúmulo de toxinas e seu potencial papel como vetor para níveis tróficos superiores, tais estudos devem considerar possíveis efeitos agudos e crônicos aos próprios organismos contaminados.

REFERÊNCIAS

Agência de Defesa Agropecuária do Paraná – ADAPAR. Nota Técnica 02: Liberada a retirada de ostras e mexilhões no litoral do Paraná. 19 de julho de 2016. Disponível em: www.adapar.pr.gov.br. Acesso em 06 de março de 2017.

ANDERSON, D. M.; GLIBERT, P. M.; BRUKHOLDER, J. M. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. **Estuaries**, v. 25, n. 4B, p.704-726, 2002.

ANDERSON, D.M.; BURKHOLDER, J.M.; COCHLAN, W.P.; GLIBERT, P.M.; GOBLER, C.J.; HEIL, C.A.; KUDELA, R.M.; PARSONS, M.L.; RENSEL, J.E.J.; TOWNSEND, D.W.; TRAINER, V.L. & VARGO, G.A. Harmful algal blooms and eutrophication: examining linkages from selected coastal regions of the United States. **Harmful Algae**, 8: 39-53, 2008.

ANDRIGUETTO-FILHO, J. M.; CHAVES, P. T.; SANTOS, C. É. S. A. R.; LIBERATI, S. A. Diagnóstico da pesca no litoral do estado do Paraná. *Martins, AS, Haimovici, M., Andriguetto-Filho, JM, A pesca marinha e estuarina do Brasil no início do século xxi: recursos, tecnologias, aspectos socioeconômicos e institucionais*, 117-140, 2006.

BARROS, B.; SAKAI, Y.; HASHIMOTO, H.; GUSHIMA, K.; VALLINOTO, M. “Better off alone than in bad company”: agonistic colour display in mimetic juveniles of two ephippid species. **Journal of Fish Biology**, 81, 1032–1042, 2012.

BARROS, B.; SAKAI, Y.; ARAÚJO, F.A.; VALLINOTO, M. Trophic adaptability of late juvenile Atlantic spadefish *Chaetodipterus faber* (Teleostei: Ephippidae) related to habitat preferences in an estuary in northeastern Brazil. **Hydrobiologia** v. 717, p. 161–167, 2013.

BARROS, B.; SAKAI, Y.; PEREIRA, P. H. C.; et al. Comparative allometric growth of the mimetic Ephippid Reef Fishes *Chaetodipterus faber* and *Platax orbicularis*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–16, 2015.

BIGARELLA, J.J.; BECKER R.D.; MATOS, D.J.; WERNER, A. **A Serra do Mar e a porção oriental do Estado do Paraná – um problema de segurança ambiental e nacional (contribuição à geografia, geologia e ecologia regional)**. Curitiba, Governo do Estado do Paraná, Secretaria de Estado do Planejamento/Associação de Defesa e Educação Ambiental (ADEA), p. 248, 1978.

BOLCH, C. J. S.; DE SALAS, M. F. A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the *Alexandrium "tamarensis complex"* to Australasia. **Harmful Algae**, v.6, n.4, p. 465-485, 2007.

BRANDINI, F.P.; THAMM, C.A.; VENTURA, I. Ecological studies in the Bay of Paranaguá. III. Seasonal and spatial variations of nutrients and chlorophyll-a. **Nerítica** v. 3, p. 1-30, 1988.

BURGESS, W. E. Suborder Acanthuroidei – Ehippidae In *FAO Species Identification Sheets for Fishery Purposes. Western Central Atlantic (Fishing Area 31)*, Vol. 2 (Burgess, W. E. & Fischer, W., ed.) pp. 1799–1800. Rome: FAO, 1978.

BUTRON, A.; ORIVE, E.; MADARIAGA, I. Potencial risk of harmful algae transport by ballast waters: The case of Bilbao Harbour. **Marine Pollution Bulletin**, v.62, n. 4, p. 747-757, 2011.

CAPPER, A. ; FLEWELLING, L. J.; ARTHUR, K. Dietary exposure to harmful algal bloom (HAB) toxins in the endangered manatee (*Trichechus manatus latirostris*) and green sea turtle (*Chelonia mydas*) in Florida, USA. **Harmful Algae**, v 28, p. 1–9, 2013.

CASTRO, N. O.; MOSER, G. A. O. Florações de algas nocivas e seus efeitos ambientais. **Oecologia Australis**, v. 16, p. 235-264, 2012.

DITTY, J. G.; SHAW, R. F.; COPE, J. S. A re-description of atlantic spadefish larvae, *Chaetodipterus faber* (family: Ehippidae), and their distribution, abundance and seasonal occurrence in the northern Gulf of Mexico. **Fishery Bulletin** 92: 262–274. 1994.

DYHRMAN, S.T. Molecular approaches to diagnosing nutritional physiology in harmful algae: implications for studying the effects of eutrophication. **Harmful Algae**, 8: 167-174, 2008.

DYSON, K.; HUPPERT, D. D. Regional economic impacts of razor clam beach closures due to harmful algal blooms (HABs) on the Pacific coast of Washington. **Harmful Algae**, v. 9, n.3, p. 264-271, 2010.

ESCOFFIER, N.; GAUDIN, J.; MEZHOUD, K.; HUET, H.; CHATEAU-JOUBERT, S.; TURQUET, J.; CRESPEAU, F.; EDERY, M. Toxicity to medaka fish embryo development of okadaic acid and crude extracts of *Prorocentrum dinoflagellates*. **Toxicon**, 2007, 49, 1182–1192, 2007.

EURLMB 2015. EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS, version 5. Disponível em: <<http://aesan.msssi.gob.es/>>

FÁVARO, L.F. **A ictiofauna de áreas rasas do Complexo Estuarino Baía de Paranaguá, Paraná**. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

FROESE, R.; PAULY, D. Editors. 2017.FishBase. World Wide Web electronic publication. Disponível em: <www.fishbase.org> Acesso em 04 de abril de 2017.

GRANÉLI, E. & JOHANSSON, N. Increase in the production of allelopathic substances by *Prymnesium parvum* cells grown under N- or P-deficient conditions. **Harmful Algae**, 2: 135-145, 2003.

GRANÉLI, E.; WEBERG, M. & SALOMON, P.S. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: the role of eutrophication. **Harmful Algae**, 8: 94-102, 2008.

HALLEGRAEF, G. M. Harmful algal blooms: a global review. In: HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, A. D. (Eds), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Paris, UNESCO, pp. 25-49, 2003.

HALLEGRAEFF, G. M. Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms – a formidable predictive challenge. **Journal of Phycology**, v. 46, n. 2, p. 220-235, 2010.

HAYSE, J. W. Feeding Habits, Age, Growth, and Reproduction of Atlantic Spadefish *Chaetodipterus faber* (Pisces: Ephippidae) in South Carolina. **Fishery Bulletin**, v. 88, p. 67-83, 1990.

HEEMSTRA, P. C. Ephippidae – spadefishes (batfishes). In Carpenter, K. E. & V. Niem (eds), *FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes. The living marine resources of the western central Pacific*, Vol. 6. FAO, Rome: 3611–3622. 2001.

HEISLER, J.; GLIBERT, P.M.; BURKHOLDER, J.M.; ANDERSON, D.M.; COCHLAN, W.; DENNISON, W.C.; DORTCH, Q.; GOBLER, C.J.; HEIL, C.C.; HUMPHRIES, E.; LEWITUS, A.; MAGNIEN, R.; MARSHALL, H.G.; SELLNER, K.; STOCKWELL, D.A.; STOECKER, D.K. & SUDDLESON, M. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. **Harmful Algae**, 8: 3-13, 2008.

IBAMA. Estatística da Pesca 2007: Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis*. Brasília, 113 pp, 2007.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. Disponível em <www.cidades.ibge.gov.br>. Acesso em 28 de março de 2017.

JOHNSON, G. D. Development of fishes of the mid-Atlantic Bight, an atlas of egg, larval, and juvenile stages. *Vol. IV: Carangidae through Ephippidae*. U.S. Fish. Wildl. Serv., Biol. Servo Prog. FWS/OBS-78/12, 314 p., 1978.

KOLM, H. E.; SCHOENENBERGER, M. F. B.; PIEMONT, M. R.; SOUZA, P. S. A.; SCHNELL, E.; SCUHL, G. Temporal variation of bacteria in superficial waters of Paranaguá and Antonina Bays, Paraná, Brazil. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v. 45, p. 27-34, 2002.

KUITER, R. H.; DEBELIUS, H. *Surgeonfishes, Rabbitfishes and Their Relatives: A Comprehensive Guide to Acanthuroidei*. TMC Publishing, Chorleywood: 208 pp. 2001.

LANA, P.C.; MARONE, E.; LOPES, R.M.; MACHADO, E.C. Coastal Marine Ecosystems of Latin America. The Subtropical Estuarine Complex of Paranaguá Bay, Brazil. **Springer**, p.131-145, 2001.

LANDSBERG, J. H. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. **Reviews in Fisheries Science**, v. 10, n. 2, p. 113-390, 2002.

MAFRA, L. L. Jr.; TAVARES, C. P. S.; SCHRAMM, M. A. Diarrheic toxins in field-sampled and cultivated *Dinophysis* spp. Cells from southern Brazil. **J Appl Phycol**, 2013.

MAFRA, L. L. Jr.; TAVARES, C. P. S.; SCHRAMM, M. A. Diarrheic toxins in field-sampled and cultivated *Dinophysis* spp. cells from southern Brazil. **J Appl Phycol**, 26:1727-1739, 2014.

MAFRA, L. L. Jr.; RIBAS, T.; ALVES, T. P.; PROENÇA, L. A. O.; SCHRAMM, M. A.; UCHIDA, H.; SUZUKI, T. Differential okadaic acid accumulation and detoxification by oysters and mussels during natural and simulated *Dinophysis* Blooms. *Fisheries Science*, 81(4): 749-762, 2015.

MPA. *Boletim de Pesca e Aquicultura 2011*. Ministério da Pesca e Aquicultura. 128 pp. 2012.

MPA. *Diário Oficial da União*, de 9 de maio de 2012, Seção 1, pág. 55, Art. 6º do ANEXO I. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2012.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**, 4 ed., p. 624, 2006.

NOERNBERG, M. A.; LAUTERT, L. F. C.; ARAÚJO, A. D.; MARONE, E.; ANGELOTTI, R.; NETTO, JR., J. P. B.; KRUG, L. A. Remote Sensing and GIS Integration for Modelling the Paranaguá Estuarine Complex –Brazil. **Journal of Coastal Research**, Special Issue, v.39, p. 1627–1631, 2004.

PAERL, H. W.; HALL, N. S.; CALANDRINO, E. S. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 10, p. 1739-1745, 2011.

PICHLER, H. A. **A ictiofauna em planícies de maré da Baía dos Pinheiros, Paraná**. 2005. 68f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná. 2005.

PIERRI, N; ANGULO, R. J.; SOUZA, M. C.; KIM, M. K. A ocupação e o uso do solo no litoral paranaense: condicionantes, conflitos e tendências. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, Editora UFPR, n. 13, p. 137-167, jan./jun, 2006.

PROENÇA, L.A.O.; SCHRAMM, M.A.; TAMANAHA, M.S.; ALVES, T.P. Diarrhoetic shellfish poisoning (DSP) outbreak in Subtropical Southwest Atlantic. *Harmful Algae News*, 33, 19–20, 2007.

REGUERA, B. Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas. In: SAR, E. A.; FERRARIO, M. E.; REGUERA, B. (Ed.). **Floraciones algales nocivas en el Cone Sur Americano**. Vigo: Instituto Español de Oceanografía, p. 21-54, 2002.

REGUERA, B.; SUÁREZ, L. V.; RAINE, R.; PARK, M. G. Harmful *Dinophysis* species: A review. **Harmful Algae**, v. 14, p. 87-106, 2014.

SHUMWAY, S. E. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 21, n. 2, p. 65-104, 1990.

SIPIÄ, V.; KANKAANPÄÄ, H; MERILUOTO, J.; HØISÆTER, T. The first observation of okadaic acid in flounder in the Baltic Sea. **Sarsia**, 85:5-6, 471-475, 2000.

SMITH, C.L. *National Audubon Society field guide to tropical marine fishes of the Caribbean, the Gulf of Mexico, Florida, the Bahamas, and Bermuda*. Alfred A. Knopf, Inc., New York. 720 p, 1997.

SVENSSON, S. Depuration of okadaic acid (Diarrhetic Shellfish Toxin) in mussels, *Mytilus edulis* (Linnaeus), feeding on different quantities of nontoxic algae. **Aquaculture**, v. 218, n. 1-4, p. 190-199, 2010.

UNIVALI/CTTMar. *Boletim estatístico da pesca industrial de Santa Catarina* - Ano 2012. Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Itajaí, SC. v. 13, n. 1, 66 pp, 2013.

VALDIGLESIAS, V.; PREGO-FARALDO, M. V.; PÁ SARO, E. et al. Okadaic Acid: More than a Diarrhetic Toxin. **Marine Drugs**, v. 11, p. 4328-4349, 2013.